



ARTICLE

# 초음파를 이용한 프로바이오틱스 분말의 유통기한 연장 및 생존율 증대 효과

홍동기 · 정성은 · 이명희 · 이호진 · 이재호 · 나국남 · 최일동 · 이정열 · 심재현\*

(\*)한국야쿠르트 중앙연구소



## Shelf-Life Extension and Increase in Survivability of Probiotics Powder by Ultrasonic Treatment

Dong-Ki Hong, Seong-Eun Jung, Myoung-Hee Lee, Ho-Jin Lee, Jae-Ho Lee, Guk-Nam Na, Il-Dong Choi, Jung-Lyoul Lee, and Jae-Hun Sim\*

Research and Business Development Center, Korea Yakult Co., Ltd., Yongin, Korea

Received: December 20, 2018  
Revised: December 24, 2018  
Accepted: December 25, 2018

\*Corresponding author :  
Jae-Hun Sim  
Research and Business Development  
Center, Korea Yakult Co., Ltd., Yongin,  
Korea  
Tel : +82-70-7835-6000  
Fax : +82-31-8005-7831  
E-mail : jhsim@re.yakult.co.kr

Copyright © 2018 Korean Society of Milk Science and Biotechnology.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

- Dong-Ki Hong  
0000-0003-2813-6017
- Seong-Eun Jung  
0000-0002-9429-709X
- Myoung-Hee Lee  
0000-0001-5596-3873
- Ho-Jin Lee  
0000-0001-8837-7037
- Jae-Ho Lee  
0000-0003-0581-8592
- Guk-Nam Na  
0000-0001-6052-6758
- Il-Dong Choi  
0000-0002-1235-0441
- Jung-Lyoul Lee  
0000-0001-7900-9881
- Jae-Hun Sim  
0000-0001-8759-3037

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of ultrasonic treatment during probiotics production process on the shelf life and the survival rate. Once *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* were cultured in edible culture medium, ultrasonic treatment was performed at 100 Hz for 1, 2, 5, 7, and 10 minutes. Ultrasonic-treated *L. plantarum* HY7715 and *B. longum* HY8001 were centrifuged, mixed with a cryoprotectant, and lyophilized. The prepared lactic acid bacteria powder was individually packaged. After 6 months, viable cell counts were measured separately under cold storage and room temperature. *In vitro* digestion experiments were performed to determine the survival rate at digestive tract. As a result, it was observed that shelf life and survival rate were increased compared to untreated control group.

Keywords

probiotics, shelf-life, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, survivability, ultrasonic treatment

### 서론

프로바이오틱스(Probiotics)는 “장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제제”라고 Fuller(1989)가 정의한 것을 시작으로 FAO/WHO는 2001년에 “충분한 양을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 도움이 되는 살아있는 미생물”이라고 정의하였다. 이에 더하여 “숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물 제제 또는 미생물의 성분”으로 정의하여 생균에서 사균으로까지 프로바이오틱스의 범위를 확대시킨 해석도 있다(Salminen 등, 1999). 프로바이오틱스를 포함한 인간의 장내 미생물이 인간의 건강에 중요한 영향을 미친다는 연구결과(Singh 등, 2013; Butel, 2014) 및 기능성 자료가 증가함에 따라 프로바이오틱스에 대한 소비자들의 인식이 더욱 확대되어 프로바이오틱스 제품의 수요가 점차 증가하고 있다. 현재 식약처에서 등재한 *Lactobacillus* 11종(*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*)과 *Lactococcus* 1종(*Lc. lactis*), *Enterococcus* 2종(*E. faecium*, *E. faecalis*), *Streptococcus* 1종(*S. thermophilus*), 그리고 *Bifidobacterium* 4종(*B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis*)까지

19종의 균에 대해 프로바이오틱스로 고시하였고, 많은 기업체들이 프로바이오틱스에 연구 및 제품을 판매하고 있다.

대표적인 프로바이오틱스의 기능성으로는 유해균 억제, 유산균 증식, 배변활동을 원활하게 도와주는 기본적인 기능성분만 아니라, 다양한 연구와 임상결과에 따르면 정장작용, 과민성장증후군, 아토피, 변비, 여성 질환 등 다양한 효능을 가지고 있다. 하지만 이러한 프로바이오틱스는 섭취시 위산 및 담즙산에 의해 세포막이 손상이 되면서 프로바이오틱스 본래의 기능성이 감소할 수 있다. 따라서 이러한 문제점을 극복하고자 현재 프로바이오틱스를 생산하는 업계에서는 고농도의 균주를 투입하거나 혹은 추가적인 공정을 통해서 코팅을 하여 제품을 판매하고 있지만, 프로바이오틱스 원료의 과투입은 제품의 가격이 상승하여 소비자에게 큰 부담을 줄 수 있을 뿐만 아니라, 일일 섭취량의 이상의 생균을 섭취하게 되면 부작용이 일어날 수 있는 문제점이 있다. 또한 코팅 기술 적용은 고가의 설비와 코팅제 투입으로 인하여 제품 가격이 상승하고, 추가적인 공정이 추가됨에 따라 공정 관리 및 제품 오염에 대한 안정성을 확보하기 힘든 단점도 있다.

초음파는 세포 파괴, 기능성 성분의 추출 효율 개선, 유화, 분산, 기포 제거, 원재료 세척 등 전처리 및 나노화에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있으며, 다양한 식품 산업분야에서 안전하게 적용이 가능한 기술이다(Stoffer 등, 1991; Vinatoru 등, 1997; Singh 등, 2001; Freitas 등, 2005; Raviyan 등, 2005). 또한 프로바이오틱스 배양 중 저온, 고온의 온도 스트레스나 산, 염기의 pH 스트레스와 같은 즉각적인 배양환경의 변화는 특이적인 유전자 발현 등 방어기작을 유발하여 저장안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Arnaud 등, 1996; Guchte 등, 2002).

따라서 본 연구에서는 프로바이오틱스 분산 및 코팅제 효율향상이 가능한 초음파 처리를 사용하여 제품의 유통안정성을 확인하였고, 소화관 생존율 미치는 영향을 확인하고자 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 균주 및 배양 조건

실험에 사용된 *Lactobacillus plantarum* HY7715 및 *Bifidobacterium longum* HY8001 균주는 (주)한국아쿠르트에서 분양 받아 37°C, 18시간 동안 최소 3번 계대 배양하여 사용하였다. 초음파 코팅에 사용할 균주 생산을 위해 *L. plantarum* HY7715, 34°C, pH 5.0, 18시간 조건 그리고 *B. longum* HY8001은 34°C, pH 6.0, 21시간 배양을 하였다.

### 2. 초음파 처리 및 분말 제조

배양이 완료된 유산균을 초음파를 100Hz 조건에서 1분, 2분, 5분, 7분 및 10분 간격으로 일정한 파장으로 물리적 자극을 가하였다. 초음파 처리가 완료된 *L. plantarum* HY7715 및 *B. longum* HY8001의 균주를 8,000 rpm, 15분간 원심분리 후 유산균만 획득하여 동결보호제를 혼합 후 -70°C에서 6시간 동결 후 동결건조를 하여 유산균 분말을 제조하였다.

### 3. 소화관 생존율 측정

Minekus 등(2014)의 방법에 따라 초음파 코팅된 균주의 소화관 생존율을 확인하였다. 동결건조 분말을 최종 농도가  $1 \times 10^9$  CFU/mL가 되도록 PBS 완충용액에 용해하였다. 구강 단계에서는  $1 \times 10^9$  CFU/mL PBS 완충용액에 제조한 프로바이오틱스 시료에 SSF(Simulated Salivary Fluid) 전해질 용액 및 인체유래 알파-아밀라제( $\alpha$ -amylase)를 첨가하고 pH 7.0로 조절하여 37°C에서 2분간 반응시켰다.

위 단계에서는 구강 단계에서 소화된 시료에 SGF(Simulated Gastric Fluid) 전해질 용액과 돼지유

래 펩신을 첨가하고, pH 3.0으로 조절하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다.

소장단계에서는 위 단계에서 소화된 시료에 돼지유래 판크레아틴 및 담즙산을 첨가하여 pH 7.0으로 조절한 뒤 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다.

마지막 흡수 단계에서는 소장단계에서 소화된 시료에 자연막소포(Brush Border Membrane Vesicles)를 첨가하고 pH 7.0으로 조절한 뒤 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다.

#### 4. 유통안정성 측정

프로바이오틱스 완제품의 유통과정에서의 안정성을 확인하기 위하여 프로바이오틱스 동결건조분말 10%에 식이섬유 35%, 올리고당 10%, 향미분말 25% 및 유당혼합분말 10%를 첨가하여 고속회전 혼합기에서 완전 혼합한 후 포장하여 제조하였다.

### 결과 및 고찰

초음파의 처리 시간에 따른 유산균의 생존율을 확인하기 위하여 유산균 동결건조 분말 100%를 스틱 포장하여 온도 40°C, 습도 70%의 조건에서 4주 동안 가속시험을 진행하였다(Fig. 1과 Fig. 2). 대조군은 유산균을 배양 후 초음파 처리를 제외하고는 동일한 방법으로 제조하였다. '생존율'은 가속안정성 시험 진행 후 생존균 수를 가속안정성 시험 진행 전 생균수로 나눈 값의 백분율을 나타내었다. 대조군의 *L. plantarum* HY7715의 생존율은 25.3%, 대조군의 *B. longum* HY8001의 생존율은 20.0%인 반면, 실험군은 초음파 처리의 시간과 상관없이 대조군보다 높은 생존율을 보였다. 본 연구의 목적인 초음파 코팅의 효과가 확인됨을 알 수 있다. 또한 처리시간에 따른 생존율을 확인한 결과, *L. plantarum* HY7715 및 *B. longum* HY8001은 초음파 코팅 5분에서 가장 높은 생존율을 보였다. 5분 처리 시간을 기준으로 추가적으로 초음파 코팅 처리 시 생존율이 낮아짐을 확인하였다. 최적 처리 시간은 5분임을 확인하였다.

초음파 코팅 처리된 유산균을 소화관 생존율을 확인 조사 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 *L. plantarum* HY7715의 소화관 생존율은 대조군의 생존율보다 4% 높았고, *B. longum* HY8001의 소화관 생존율은 대조군의 생존율보다 8% 높았다. 따라서 초음파 코팅(100 Hz, 5 min) 기술은 산, 담즙 및 고온 등의 가혹한 환경에서도 유산균의 생존율을 향상시킬 수 있음을 확인하였고, 이러

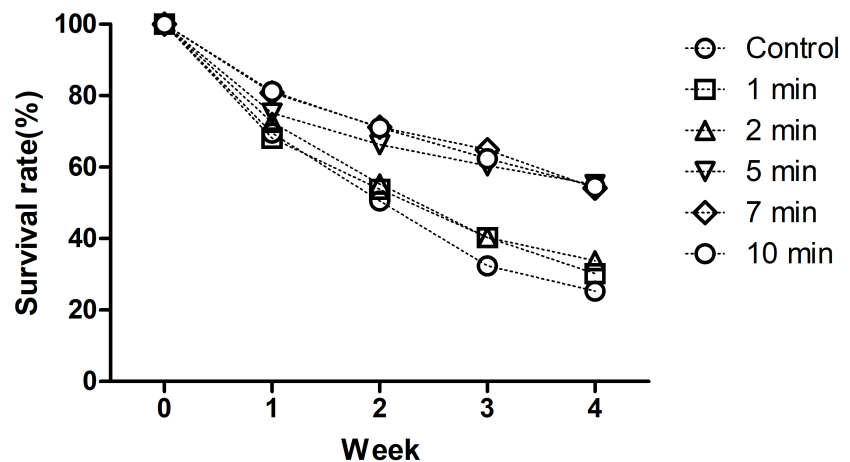


Fig. 1. An experimental study on the increase of the survival rate of the freeze-dried *L. plantarum* HY7715 powder after ultrasonic treatment.

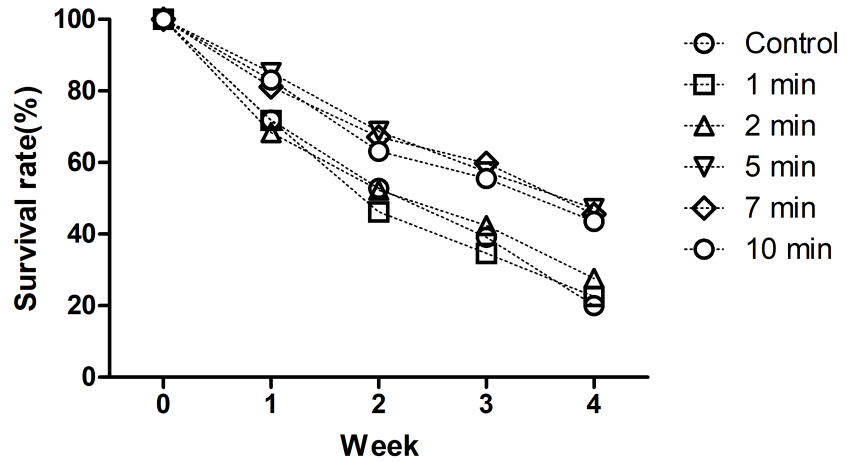


Fig. 2. An experimental study on the increase of the survival rate of the freeze-dried *B. longum* HY8001 powder after ultrasonic treatment.

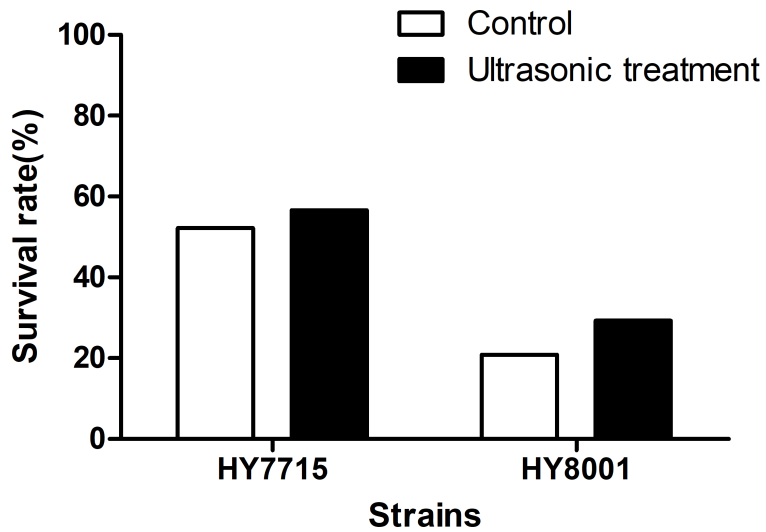


Fig. 3. The survival rate of *L. plantarum* HY7715 and *B. longum* HY8001 after passing *in vitro* digestive tract.

한 기술은 다양한 식품에 활용될 수 있을 것이라 판단된다.

가장 높은 생존율을 보인 초음파 처리 조건(5분, 100 Hz)을 적용하여 유산균 분말 제형의 완제품을 제작하여 유통환경에 따른 조건인 냉장(10°C 이하, 습도 40% 이하), 상온(25°C, 습도 40~60%) 및 가속(40°C, 습도 70%) 생존율을 6개월 동안 확인한 결과, 냉장보관의 경우의 생존율은 대조군과 초음파 처리군의 차이는 없었으나, 상온보관의 경우에는 *L. plantarum* HY7715의 생존율은 대조군의 생존율보다 약 14~15% 높았고, *B. longum* HY8001의 생존율은 대조군의 생존율보다 약 13~15% 확인되었다. 가속 실험의 경우에는 *L. plantarum* HY7715의 생존율은 대조군의 생존율보다 약 15~16% 높았고, *B. longum* HY8001의 생존율은 대조군의 생존율보다 약 15~17% 높았다 (Fig. 4).

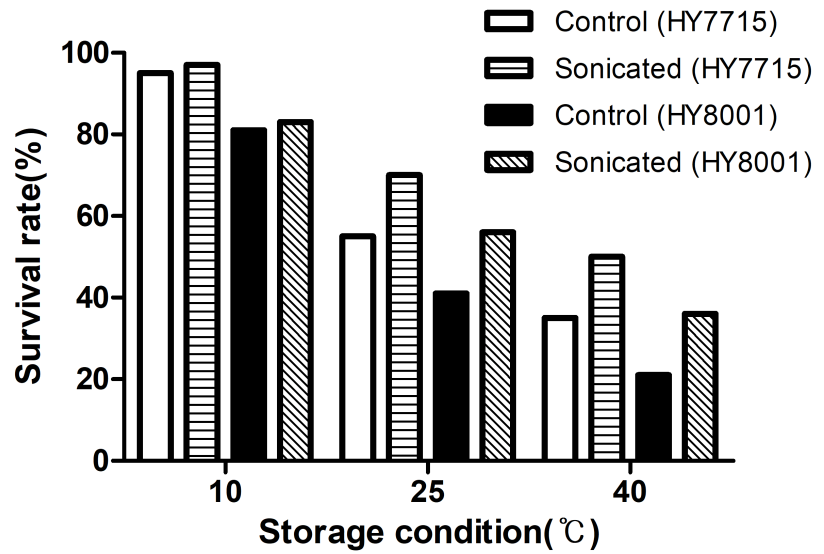


Fig. 4. The survival rate of probiotics under various storage conditions (6 month).

이러한 결과를 바탕으로 초음파 처리는 프로바이오틱스 생산에 적용하여 유산균의 생존율을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 본 실험에 사용된 초음파 코팅 기술은 가공 공정 및 저장기간 그리고 다양한 유통조건에서도 유산균의 생존율을 향상시킬 수 있는 방법으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 추가적으로 시제품의 상온 보관 또는 가혹조건으로 보관 시 균주의 생존율 증가에 유의적인 영향을 미칠 수 있어, 본 연구에 사용된 기술은 다양한 프로바이오틱스에 적용 가능한 효율적이고, 저비용의 초음파 코팅 기술이라고 판단된다. 초음파 스트레스에 따른 유전자 발현 변화와 유통안정성에 관한 추가적인 연구가 필요할 것을 판단되며, 프로바이오틱스 균종별, 코팅제 종류 및 초음파 처리 조건에 대한 조합을 통하여 최적 공정에 대한 연구도 추가적으로 필요할 것으로 판단된다.

## 요약

프로바이오틱스의 배양 및 동결건조 과정에서 프로바이오틱스가 사멸하지 않을 정도의 초음파 처리를 통하여 프로바이오틱스의 생존율 및 안정성이 높아지고, 코팅제가 골고루 분산되어 코팅 효율이 높아져 프로바이오틱스의 유통안정성 및 소화 생존율이 개선됨을 확인하였다.

## References

- Arnau, J., Sørensen, K. I., Appel, K. F., Vogensen, F. K. and Hammer, K. 1996. Analysis of heat shock gene expression in *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology*. 142: 1685-1691.
- Butel, M. J. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Med. Maladies. Infect.* 44:1-8.
- Freitas, S., Hielscher, G., Merkle, H. P. and Gander, B. 2005. Continuous contact-and contamination-free ultrasonic emulsification- A useful tool for pharmaceutical development and production. *Ultrason. Sonochem.* 13:76-85.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.



- Guchte, V. M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. Pages 187-216 In *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*. Siezen, R. J., Kok, J., Abee, T., Schasfsma, G., ed. Springer, Dordrecht.
- Minekus M, Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carri`ere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. and Brodkorb, A. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - An international consensus. *Food Funct.* 5:1113-1124.
- Raviyan, P., Zhang, Z. and Feng, H. 2005. Ultrasonication for tomato pectinmethyl-esterase inactivation: Effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *J. Food Eng.* 70:189-196.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, Y. K. 1999. Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci. Tech.* 10:107-110.
- Singh, H., MacRitchie, F. 2001. Use of sonication to probe wheat gluten structure. *Cereal Chem.* 78:526-529.
- Singh, V. P., Sharma, J., Babu, S., Rizwanulla and Singla, A. 2013. Role of probiotics in health and disease: A review, *J. Pak. Med. Assoc.* 63:253-257.
- Stoffer, J. O. and Fahim, M. 1991. Ultrasonic dispersion of pigment in water based paints. *J. Coating Technol.* 63:61-68.
- Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D. and Mason, T. J. 1997. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason. Sonochem.* 4:135-139.